

УДК: 543.544

ВЫБОР ОПТИМАЛЬНЫХ ПАРАМЕТРОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СКВАЛЕНА МЕТОДОМ ХРОМОТОГРАФИИ В ТОНКОМ СЛОЕ

Н.Я.Мокшина, А.А.Назарова, В.Ф.Селеменев, Е.Ф.Сафонова
Воронежский государственный университет
394006, Воронеж, Университетская пл., 1
march_rabbit@list.ru

Поступила в редакцию 26 ноября 2005 г.

Сквален – один из компонентов жирных растительных масел, определяющих их лечебно-профилактические свойства. Разработана экспресс-методика определения сквалена в растительных маслах, применяемая как в лабораторно-исследовательских целях, так и для промышленного контроля в пищевых и фармацевтических производствах.

Мокшина Надежда Яковлевна – кандидат химических наук, доцент кафедры аналитической химии Воронежского госуниверситета. Ученый секретарь комиссии по истории и методологии аналитической химии Научного совета по аналитической химии РАН.

Область научных интересов: экстракция биологически активных веществ, спектральные и хроматографические методы их определения.

Автор 120 публикаций.

Селеменев Владимир Федорович – доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой аналитической химии Воронежского госуниверситета.

Область научных интересов: процессы разделения и концентрирования биологически активных веществ.

Автор более 600 публикаций.

Назарова Александра Александровна – магистрант кафедры аналитической химии Воронежского госуниверситета.

Сафонова Елена Федоровна – кандидат химических наук, доцент кафедры фармхимии и фармтехнологии Воронежского госуниверситета.

Область научных интересов: выделение и разделение биологически активных веществ из природных объектов.

Автор более 100 публикаций.

Сквален (рис. 1) – непредельный ациклический углеводород, важнейшее биологически активное вещество, интермедиат многих метаболических процессов в живых организмах. Как предшественник синтеза холестерина и других стероидов [1], сквален вырабатывается организмом самостоятельно. При нарушении биосинтеза сквалена возникают опасные заболевания кожи, для лечения которых необходима терапия с использованием сквалена растительного или животного происхождения. Например, в печени глубоководной акулы содержание сквалена достигает 60%, именно из печени в Японии создан препарат “Deep Shark Oil” для лечения онкологических заболеваний кожи. Однако использование различных органов животных для получения лекарств, содержащих сквален, сопряжено с рядом проблем, в первую очередь, экономических и экологических.

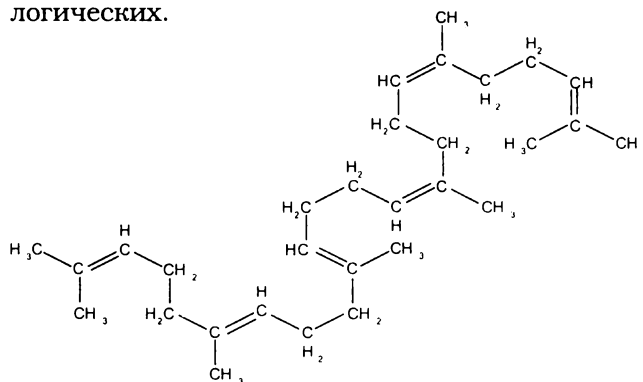


Рис.1. Структурная формула сквалена: 2,6,10,15,19,23-гексаметил-2,6,10,14,18,22-тетракозагексаен.

Среди продуктов растительного происхождения сквален чаще всего встречается в жирных маслах, однако его содержание в них невелико, как правило, не более 1 %. Больше всего этого вещества содержится в масле зародышей пшеницы и масле из виноградных косточек – около 2 %, в масле из семян амаранта – до 8 %.

Содержание сквалена – важный критерий фармакотерапевтической активности масла. Цель исследования состоит в разработке методики определения сквалена в растительных маслах с применением хроматографии в тонком слое (ТСХ).

Перед проведением анализа методом ТСХ необходимо выбрать детектирующий реагент – вещество, взаимодействующее с разделяемыми компонентами с образованием ярко окрашенных продуктов, легко идентифицируемых визуально. Для этой цели нами применены концентрированная серная кислота, 5 %-ный этанольный раствор фосфорномолибденовой кислоты и йод. Обнаружение сквалена в УФ-свете проводили по реакции с родамином 6Ж [2].

Йод и концентрированная серная кислота являются специфическими реагентами на непредельные углеводороды, к классу которых относится сквален. Однако окраска зон парами йода быстро теряет свою интенсивность, поэтому пластины, проявленные таким способом, непригодны для количественного анализа с применением компьютерного сканирования. В присутствии серной кислоты образуются четкие пятна разделяемых компонентов, но сканирование таких пластин невозможно вследствие вредного воздействия серной кислоты на оргтехнику. Родамин 6Ж – неселективный проявитель, пригоден для обнаружения веществ в УФ-свете, что ограничивает применение этого реагента только качественными определениями.

Фосфорномолибденовая кислота (ФМК) также является неспецифическим проявителем, позволяющим обнаруживать многие разделяемые компоненты. Зоны веществ имеют более высокую контрастность по сравнению с общим фоном пластины и длительное время сохраняют свою интенсивность. Поэтому ФМК применена нами для последующей обработки пластин.

Следующий этап работы состоял в выборе растворителей для определения сквалена. Известно [3], что для определения сквалена методом ТСХ в качестве элюирующей системы рекомендуется смесь гептана и бензола в соотношении 9:1. Установлено, что полярность такой системы по Снайдеру составляет 0,45 [4]. Однако определение сквалена в указанной смеси растворителей не является оптимальным из-за высоких значений R_f . Нами изучены несколько элюирующих систем, в которых анализировали стандартный раствор сквалена фирмы "ICN Biomedical" с концентрацией 0,01 моль/л, объем наносимой пробы 1 мкл. По хроматограммам для каждой элюирующей системы рассчитана относительная

скорость перемещения R_f (табл. 1). Установлено, что сквален лучше всего разделяется в системах с полярностью ≤ 0 , в которых параметр R_f приближается к оптимальному значению 0,3 – 0,5 [5].

Таблица 1
Элюенты для разделения сквалена

Элюенты	Полярность [4]	R_f
Гептан – бензол (9:1)	0,45	0,90
Гептан	0,2	0,75
Октан	0,1	0,76
Изооктан	-0,1	0,74
Декан	-0,3	0,56

На основании данных ТСХ для всех изученных нами систем рассчитаны значения высоты, эквивалентной теоретической тарелке H , числа теоретических тарелок N и фактора удерживания K [7] (табл. 2). По совокупности всех параметров, характеризующих эффективность разделения и качество хроматографических зон, оптимальными для определения сквалена являются гептан, изооктан и декан. Поэтому дальнейшие исследования проводились именно в этих системах.

Таблица 2
Высота, эквивалентная теоретической тарелке (H), число теоретических тарелок (N) и фактор удерживания (K) по данным ТСХ

Элюенты	H	N	K
Гептан–бензол (9:1)	0,083	79,52	0,11
Гептан	0,046	158,70	0,33
Октан	0,046	154,35	0,31
Изооктан	0,043	179,07	0,35
Декан	0,050	182,00	0,79

Кроме этого, нами изучены пластины для ТСХ различных марок. Типы пластин и их характеристики представлены в табл. 3. Наиболее четкие и контрастные хроматографические зоны получены на пластинах "Плазмахром" и "Сорбфил". На пластинах "Плазмахром", предназначенных для обращенно-фазной ТСХ, дисперсия пятен минимальна и их форма симметрична, поэтому они предпочтительнее для определения сквалена.

Полученные результаты позволили сформулировать оптимальные условия разделения сквалена методом ТСХ:

- пластина "Плазмахром";
- элюент – декан;
- проявитель – 5 %-ный этанольный раствор фосфорномолибденовой кислоты;
- концентрация стандартного раствора сквалена 0,01 моль/л.

Таблица 3

Характеристика пластин для ТСХ

Пластины	Размер, см-см	Неподвижная фаза / связующее вещество	Дисперсия пятна
Silufol	5-15	Силикагель / крахмал	0,8 / 0,9
Сорбфил	10-10	Силикагель / силиказоль	0,7 / 0,8
Армсорб	10-20	Силикагель / силиказоль	0,5 / 1,0
Плазмахром	10-10	Силикагель / силиказоль	0,5 / 0,5
Shliecher & Schull	15-15	Полиамид / –	0,7 / 0,7

Количественное определение сквалена в тонком слое сорбента проводили с использованием программы "Sorbfil Videodensitometer" после предварительного компьютерного сканирования. Для этого получены хроматограммы серии стандартных растворов сквалена с концентрациями 0,0016; 0,0050; 0,0084; 0,0117; 0,0168 и 0,0252 моль/л в гептане, изооктане и декане. После обработки пластин проявителем хроматограммы сканировали, полученные изображения обрабатывали с применением программы "Sorbfil Videodensitometer". По полученным данным строили градуировочные графики зависимости площади пятна (S , мм²) от концентрации (рис.2). Все три зависимости практически совпадают, оптимальным растворителем для определения сквалена является декан.

Разработанная нами методика применена для анализа нескольких растительных масел, широко используемых в пищевой и фармацевтической промышленности. Результаты анализа хлопкового, амарантового, репейного, облепихового масел и масла из семян грейпфрута представлены в табл. 4. Наибольшее содержание сквалена обнаружено в амарантовом масле, минимальное – в масле из семян грейпфрута.

Определение сквалена методом хроматографии в тонком слое с количественной обработкой данных методом компьютерного сканирования рекомендуется для анализа сквалено-содержа-

щих препаратов в пищевой, медицинской, косметологической и фармацевтической промышленности.

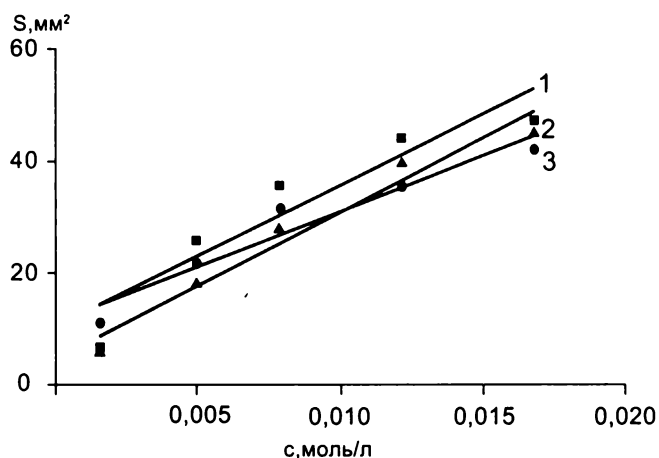


Рис.2. Градуировочные графики для определения сквалена методом ТСХ в различных элюирующих системах: растворители изооктан (1), декан (2), гептан (3).

Таблица 4

Содержание сквалена в различных растительных маслах, $n=5$, $P=0,95$

Растительное масло	Содержание сквалена, %
Хлопковое масло	$0,99 \pm 0,05$
Амарантовое масло	$4,41 \pm 0,22$
Масло из семян грейпфрута	$0,65 \pm 0,03$
Облепиховое масло	$0,84 \pm 0,04$
Репейное масло	$1,25 \pm 0,06$

ЛИТЕРАТУРА

1. Общая органическая химия / Под ред. Д.Бартон и У.Д.Оллиса. В 12 т. Т.11. Липиды, углеводы, макромолекулы, биосинтез. М.: Химия, 1986. 736 с.
2. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография : в 2-х т. / Ю.Кирхнер. М.: Химия, 1981. Т.1. 495 с.
3. Кейтс М. Техника липидологии / М.Кейтс. М.: Мир, 1975. 322 с.
4. Snyder L. R. Principles of Adsorption Chromatography / New York, USA: M.Dekker, Inc., 1968. 413 p.
5. Гейсс Ф. Основы тонкослойной хроматографии: в 2-х т. / Ф.Гейсс. Т.1. М.: Мир, 1981. 405 с.

* * * * *

CHOICE OF OPTIMUM PARAMETERS OF DEFINITION OF SQUALENE BY METHOD OF CHROMATOGRAPHY IN THIN LAYER

N.Ya.Mokshina, A.A.Nazarova, V.F.Selemenev, E.F.Safonova.

Squalene is one of components of the fat vegetable oils defining their treatment and prophylactic properties. It is developed the express train-technique of definition of squalene in the vegetable oils, applied both in the laboratory-research purposes, and for the industrial control over food and pharmaceutical manufactures.